

## **TRABAJO FIN DE GRADO**

### **Facultad de Ciencias**

**“Aplicación de un complejo metálico de  
oro (III) con fines terapéuticos  
anticancerígenos”**

**DIRECTORES:**

Elena Cerrada Lamuela y M<sup>a</sup> Jesús Rodríguez-Yoldi

**ALUMNO:**

Teresa Fuertes Novella  
Junio 2015

**ELENA CERRADA LAMUELA** Profesora Titular del departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Zaragoza.

**M<sup>a</sup> JESÚS RODRÍGUEZ-YOLDI** Profesora Titular del departamento de Farmacología y Fisiología de la Universidad de Zaragoza.

**CERTIFICAN**

Que el trabajo que se presenta bajo el título: "Aplicación de un complejo metálico de oro (III) con fines terapéuticos anticancerígenos" ha sido realizado en el Departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Ciencias y en el departamento de Farmacología y Fisiología de la Facultad de Veterinaria, bajo nuestra dirección, autorizando su presentación.

Zaragoza, 23 Junio 2015



Fdo.: Dra. Elena Cerrada



Fdo.: Dra. M<sup>a</sup> Jesús Rodríguez-Yoldi

## ÍNDICE

• <b>RESUMEN/ABSTRACT</b> .....	1
• <b>INTRODUCCIÓN</b> .....	3
1. Desarrollo y bases moleculares del cáncer.....	3
2. Regulación celular: ciclo celular y muerte.....	4
3. Compuestos metálicos en el tratamiento del cáncer.....	5
• <b>OBJETIVOS</b> .....	7
• <b>PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	7
1. Síntesis y caracterización.....	7
2. Estudios biológicos.....	9
2.1.Ciclo celular.....	9
2.2. Ensayo de viabilidad celular (MTT).....	9
2.3 Estudios de apoptosis .....	10
2.4 Estudios de ciclo celular.....	10
3. Estudios de interacción.....	10
3.1. Interacción con DNA .....	10
3.2. Interacción con Albúmina Sérica Bovina (BSA).....	11
• <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	12
1. Síntesis de los complejos [Au(Spirimidina) <sub>2</sub> (S <sub>2</sub> C=NR <sub>2</sub> )].....	12
2. Estudios biológicos .....	13
2.1. Estudios farmacocinéticos .....	13
2.2. Estudios toxicológicos.....	14
2.2.1.Apoptosis .....	14
2.2.2. Ciclo celular .....	16
3. Estudios de Interacción con DNA.....	17
3.1. Estudio de la interacción con el plásmido pIRES2-EGFP.....	17
3.2. Estudio de la interacción con DNA en el tiempo.....	17
4. Estudio de interacción con BSA (Albúmina sérica bovina).....	18
• <b>CONCLUSIONES/CONCLUSIONS</b> .....	22
• <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	24
• <b>ANEXOS</b> .....	26
Anexo I: Espectros.....	26
Anexo II: Gráficas IC <sub>50</sub> .....	28

## RESUMEN

Desde el descubrimiento accidental de la actividad antitumoral del cisplatino, se han centrado muchos esfuerzos en el diseño racional de agentes anticancerígenos basados en metales que puedan ser usados en quimioterapia.

Los compuestos de oro (III) han ganado recientemente especial interés debido a sus efectos en la inhibición del crecimiento de células tumorales, con una mayor citotoxicidad y menor número de efectos secundarios, además de una mayor biodisponibilidad, lo que se ha logrado con mecanismos de acción diferentes a los del cisplatino.

Sin embargo, existe poca literatura acerca del uso de complejos de oro (III) como agentes anticancerígenos, debido probablemente a su alto potencial redox y relativa poca estabilidad, lo que dificulta su uso en condiciones fisiológicas. Por ello, el presente trabajo se centra en la síntesis y caracterización de compuestos de oro (III) con ligandos de ditiocarbamato como agentes protectores frente a la nefrotoxicidad del cisplatino y en el estudio de su posible actividad anticancerígena.

Se han ensayado dos compuestos en células de cáncer de colon humano (Caco-2). Uno de ellos ha mostrado alta citotoxicidad, con un  $IC_{50}$  más bajo que el cisplatino. Por lo tanto, este compuesto es más efectivo a concentraciones más bajas, y presenta una apoptosis tardía además de escasos efectos secundarios. El otro compuesto ha sido descartado del estudio al mostrar una posible reacción de descomposición en condiciones fisiológicas.

El mecanismo de acción de los complejos de oro (III) sigue siendo desconocido. La unión al DNA podría ser uno de los posibles mecanismos y es el que ha sido estudiado. Los resultados muestran una interacción muy débil con el DNA por lo que no constituye la diana principal de este complejo.

Dado que la mayor parte de los fármacos anticancerígenos son administrados de forma intravenosa, el estudio de su posible interacción con componentes de la sangre es de especial interés. Para realizar este ensayo se ha elegido una de las proteínas más abundantes, la albúmina. El valor intermedio de la constante de unión de la albúmina sérica bovina con el complejo de oro podría indicar que puede ser transportado por esta proteína en la sangre y fácilmente liberado en su órgano diana.

## ABSTRACT

Since the discovery of the cisplatin antitumor activity, great efforts have focused on the rational design of metal-based anticancer agents that can be potentially used in cancer chemotherapy.

Gold (III) complexes have recently gained increasing attention due to their strong tumor cell growth-inhibiting effects, higher cytotoxic activity combined with negligible toxic side effects, and higher bioavailability, generally achieved by exploiting non-cisplatin-like mechanisms of action.

Nevertheless, there is a paucity of data on gold (III) complexes that probably derives from their high redox potential and relatively poor stability, which make their use rather problematic under physiological conditions. Therefore, the actual work is focused on the synthesis and characterization of gold (III) complexes with dithiocarbamato ligands as protective agents from cisplatin nephrotoxicity and on the study of their possible anticancer activity.

Two compounds have been tested on human colon cancer cells (Caco-2). Notably, one of these compounds exhibits relevant antiproliferative effects with an  $IC_{50}$  lower than cisplatin. So, this compound is more effective at lower concentrations. Moreover, it has shown late apoptosis and limited toxic side effects. The other compound has been discarded from this study owing to its possible decomposition under physiological conditions.

The mechanism of action of gold (III) complexes remains unclear. DNA binding is one of the possible mechanisms and it is the one which has been studied. The results have shown a weak interaction with DNA, this is the reason why it cannot be considered as the main target of the complex.

Considering that most of the anticancer drugs are intravenously administrated, the study of their possible interaction with blood components is of general interest. The moderate value of the binding constant to serum albumin could indicate that it can be stored and carried by this protein in the body and be easily released to the target.

## INTRODUCCIÓN

La proliferación, diferenciación y supervivencia de las células individuales en los organismos pluricelulares se regulan cuidadosamente para atender los requerimientos del organismo como un todo. La alteración de estos mecanismos reguladores que dirigen el comportamiento de la célula normal es la causa del cáncer, segunda causa de muerte mundial después de las enfermedades cardiovasculares, según la OMS.<sup>1</sup>

### 1. Desarrollo y bases moleculares del cáncer<sup>2</sup>

Las células cancerosas se definen por dos propiedades heredables:

1) Proliferan en contra de las limitaciones normales.

2) Invaden y colonizan territorios que en condiciones normales están reservados para otras células.

La combinación de estas dos características determina un peligro mortal.

Las células que tienen la primera propiedad (pero no la segunda) proliferan de forma excesiva, pero permanecen agrupadas en una sola masa que produce un tumor; en este caso se dice que es un **tumor benigno** y, por lo general, puede extirparse de forma completa.

Un tumor es canceroso sólo si sus células tienen la capacidad de invadir los tejidos circundantes; en este caso se dice que es un **tumor maligno**. Las células tumorales malignas con esta propiedad invasora pueden separarse del tumor primario, ingresar en el torrente sanguíneo o en los vasos linfáticos y formar tumores secundarios o metástasis en otros sitios del cuerpo. Cuanto más se disemina el cáncer más difícil es erradicarlo.

Puesto que el desarrollo del cáncer es un proceso multietapa complejo, son muchos los factores que pueden influir. De todas formas, se han encontrado muchos agentes que se sabe contribuyen a la etiología del cáncer, entre los que se incluyen la radiación, carcinógenos químicos y virus. La radiación y los productos químicos actúan dañando el DNA e introduciendo mutaciones.

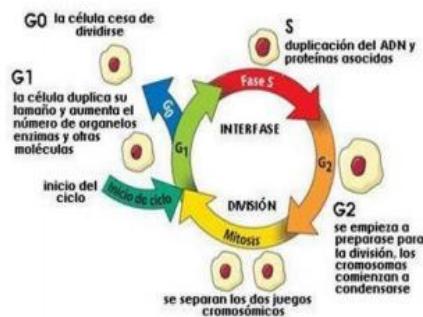
Sin embargo, la secuencia completa de los procesos que se requieren para el desarrollo de cualquier cáncer humano todavía no se conoce, pero está claro que tanto la activación de los **oncogenes** como la inactivación de los **genes supresores de tumores** son pasos críticos en la iniciación y progresión del tumor.

La anomalía más común del **cáncer de colon** corresponde a una delección o a la inactivación de un gen supresor de tumores llamado gen de la poliposis adenomatosa colónica (APC). Este gen codifica para una proteína inhibidora que en condiciones normales limita la activación de una vía de señalización intercelular, denominada vía Wnt, que interviene en la estimulación de la proliferación celular en las criptas del revestimiento intestinal.

En el tratamiento con quimioterapia del cáncer de colon se emplean derivados de platino, en concreto, el oxaliplatino (figura 3), en combinación con 5-fluorouracilo y leucovorina como adyuvantes<sup>3</sup>. Normalmente, se recomienda este tipo de quimioterapia acompañada de radioterapia antes de una intervención quirúrgica.

## 2. Regulación celular : Ciclo celular y muerte

El ciclo de la división de la mayoría de las células eucariotas se divide en cuatro fases diferenciadas: M, G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>. La fase **M** corresponde a la mitosis, a la que le suele seguir la citocinesis. Durante la fase **G<sub>1</sub>**, la célula es metabólicamente activa y crece. Seguidamente, tiene lugar la fase **S** durante la que se produce la replicación del DNA. Tras finalizar la síntesis del DNA, se produce la fase **G<sub>2</sub>** durante la que prosigue el crecimiento de la célula y en la que se sintetizan proteínas en preparación para la mitosis.

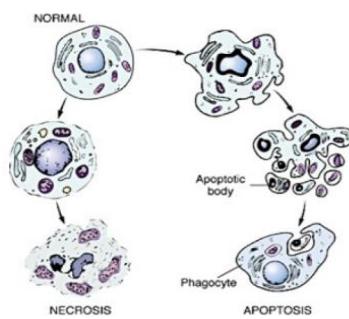


**Figura 1.** Fases del ciclo celular  
(Ramos. Fisiología del Ser humano).

La coordinación entre las distintas fases del ciclo celular depende de un sistema de puntos de control que previenen la entrada en la siguiente fase del ciclo celular hasta que los eventos de la fase precedente hayan sido completados. Además, los puntos de control de daños al DNA, garantizan que el DNA dañado no se replique ni se transmita a las células hijas.

La **muerte celular** y la proliferación celular están equilibradas durante la vida de los organismos pluricelulares. Durante el desarrollo, la muerte celular programada juega un papel clave eliminando las células no deseadas de una variedad de tejidos.

En contraste con la muerte accidental de las células que resulta de una lesión aguda (necrosis), la muerte celular programada es un proceso activo, que tiene lugar generalmente mediante una serie concreta de cambios celulares conocidos como **apoptosis**<sup>4</sup>. Durante la apoptosis, el DNA cromosómico generalmente es fragmentado como resultado de la escisión entre nucleosomas. La cromatina se condensa y a continuación el núcleo se disgrega en pequeños fragmentos. Finalmente, la célula se encoge y se rompe en fragmentos envueltos de membrana denominados cuerpos apoptóticos. Las células apoptóticas y los fragmentos celulares son reconocidos de forma eficaz y fagocitados por macrófagos rápidamente, evitando así la respuesta inflamatoria local.



**Figura 2.** Necrosis y apoptosis  
(Robbins. Anatomía Patológica, 2004).

Estudios cinéticos del crecimiento tumoral han revelado una alta frecuencia de apoptosis, tanto en tumores que regresan de manera espontánea, como en tumores tratados con quimioterapéuticos y tratamientos radiactivos<sup>5</sup>.

### 3. Compuestos metálicos en el tratamiento del cáncer

Los fármacos empleados en el tratamiento del cáncer son cada vez más eficaces, permitiendo alcanzar mejores resultados con menos efectos secundarios. La mayoría de los fármacos existentes en el mercado son sustancias orgánicas no metálicas. Dentro de estos derivados se pueden destacar: Paclitaxel (Taxol), fármaco muy efectivo en pacientes con cáncer de pulmón, ovario y mama; y 5-Fluorouracilo principalmente usado en cáncer de colon.

El uso de compuestos metálicos como agentes quimioterapéuticos se inicia con el descubrimiento accidental del **cisplatino** (figura 3), en 1965, por Roserberg. El cisplatino fue aprobado por la FDA en 1978 para el tratamiento de tumores genitourinarios, y actualmente, es un fármaco que se emplea con éxito en gran variedad de tipos de cáncer: ovárico, cervical, cerebral, testicular, pulmonar, y de vejiga entre otros. A partir de entonces, se han desarrollado otros fármacos con platino pero muy pocos de ellos se usan en clínica hoy en día; algunos de éstos, aprobados por la FDA son: carboplatino y oxaliplatino (figura 3)<sup>6</sup>.

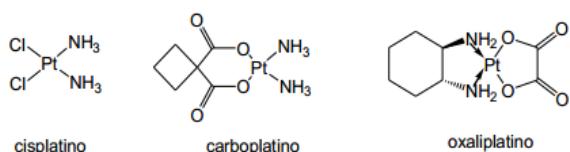


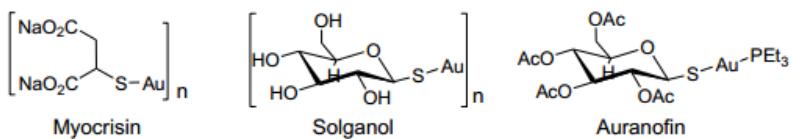
Figura 3. Cisplatino y derivados aprobados por la FDA.

Sin embargo, debido a los efectos secundarios que producen, tales como: náuseas, alopecia, ototoxicidad, neurotoxicidad, mielosupresión y nefrotoxicidad, además de la resistencia del tumor, la investigación actual se está centrándose en el diseño y desarrollo de agentes anticancerígenos alternativos basados en metales con mejores indicios quimioterapéuticos, lo que sigue siendo un gran reto en el campo de la química medicinal<sup>7</sup>.

Durante las últimas cuatro décadas, se han investigado ampliamente un gran número de compuestos metálicos y algunos de ellos se han ensayado *in vitro* e *in vivo*. Entre estos compuestos se encuentran metales como: platino (Pt<sup>II</sup> y Pt<sup>IV</sup>), rutenio (Ru<sup>II</sup> y Ru<sup>III</sup>), oro (Au<sup>I</sup> y Au<sup>III</sup>) y titanio (Ti<sup>IV</sup>)<sup>8</sup>.

El uso de los **compuestos de oro** en la medicina moderna se conoce como crisoterapia y se inicia con el descubrimiento por R. Koch en 1890<sup>9</sup> de las propiedades bacteriostáticas de K[Au(CN)<sub>2</sub>] contra la tuberculosis. La creencia de que la artritis reumatoide era provocada por el bacilo de la tuberculosis, llevó a utilizar también la terapia con compuestos de oro en el tratamiento de esta enfermedad.

Los primeros compuestos de oro (I) utilizados fueron derivados del tipo tiolato, tales como miocrisina, solganol, y auranofin (figura 4) y se aplicaron como antiinflamatorios en el tratamiento de la artritis reumatoide y otras enfermedades reumáticas<sup>10</sup>.



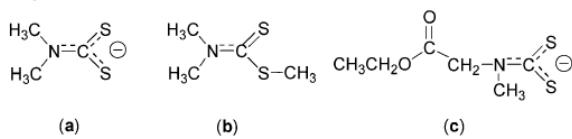
**Figura 4.** Derivados de oro empleados en artritis reumatoide.

Una de las razones principales por la que existe un gran interés en el uso de derivados de oro, es la analogía que existe entre los complejos de oro (III) y los de platino (II), ya que ambos son isoelectrónicos (configuración  $d^8$ ) e isoestructurales (geometría plano-cuadrada)<sup>11</sup>. Sin embargo, existe poca literatura acerca del uso de complejos de oro (III) como agentes anticancerígenos, debido probablemente a su alto potencial redox y relativa poca estabilidad, lo que dificulta su uso en condiciones fisiológicas<sup>12,13</sup>.

En las últimas décadas, se han desarrollado y probado como agentes anticancerígenos muchos compuestos de oro (I) y oro (III) con diferentes estructuras moleculares. Los compuestos de oro con ligandos de fosfina, ditiocarbamatos y porfirinas son los que más se han investigado<sup>14</sup>. Aunque el mecanismo de acción no está claro, los compuestos de oro comparten algunas propiedades bioquímicas relevantes, tales como: la inhibición de la enzima tiorredoxina reductasa (TrxR)<sup>15</sup>, la unión a proteínas y DNA, la inducción de la apoptosis y efectos antimitocondriales, entre otros.

En cuanto a los compuestos de oro (III), a partir de estudios sobre sus posibles mecanismos de acción, se ha observado en algunos casos que existe una interacción con el DNA, a diferencia de los compuestos de oro (I). Sin embargo, esta interacción es débil, por lo que se puede establecer que el DNA no es la diana principal de los mismos. Por otro lado, se ha encontrado que algunos compuestos de oro (III) interaccionan con proteínas e inducen efectos proapoptóticos, probablemente vía mitocondrial<sup>16</sup>.

A la hora de buscar posibles anticancerígenos basados en metales, es importante la elección de los ligandos que acompañan al metal, para de un lado dar estabilidad a la molécula, y de otro aumentar su efecto citotóxico al mismo tiempo que disminuir sus posibles efectos secundarios. El éxito del empleo de ligandos del tipo ditiocarbamato (figura 5) como agentes protectores frente a la nefrotoxicidad del cisplatino, ha permitido describir un creciente número de complejos de oro (III) que pueden llegar a ser anticancerígenos prometedores debido a su interesante actividad citotóxica *in vivo* e *in vitro*, junto con sus escasos efectos secundarios<sup>17,18</sup>.



**Figura 5.** Ligandos de ditiocarbamato: a).N,N-Dimetilditiocarbamato (DMDT), b).S-Metil-N,N-dimetilditiocarbamato (DMDTM), c).Etilsarcosinaditiocarbamato (ESDT).

## OBJETIVOS

Con estos antecedentes, y dada la existencia de estudios insuficientes acerca de los complejos de oro (III), los objetivos principales que se plantean en este trabajo son los siguientes:

- La **síntesis y caracterización** de dos complejos metálicos de oro (III) con ligandos del tipo ditiocarbamato.
- El estudio de las posibles **propiedades anticancerígenas** de estos dos complejos en células de cáncer de colon humano (Caco-2/TC7 y PD7). Para dicho estudio se llevarán a cabo:
  - **Estudios farmacodinámicos** realizados mediante ensayos de viabilidad celular (MTT) tanto en células indiferenciadas para definir la actividad y perfil de los productos, como en células diferenciadas de tipo endocitario para medir los posibles efectos secundarios.
  - **Estudios toxicológicos**, de apoptosis y ciclo celular, para determinar la toxicidad *in vitro*.
  - **Estudios de interacción** con DNA ya que es una posible diana de estos complejos, y con proteínas del plasma, en concreto, con la albúmina sérica bovina (BSA), ya que podría tener un papel importante en la biodistribución del complejo como posible candidato a emplearse como fármaco.

## PARTE EXPERIMENTAL

### 1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN

#### Espectroscopía infrarroja

Los espectros infrarrojos se han realizado en un espectrofotómetro Perkin-Elmer FT-IR Espectrum One que cubre el rango de 4000 a 200  $\text{cm}^{-1}$  acoplando un accesorio de Reflexión interna Universal Atenuada (ATR).

#### Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (R.M.N.)

Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  se han realizado en un espectrofotómetro Bruker AV-400, a 400 MHz. Los valores de desplazamientos químicos se expresan en  $\delta$  (ppm) usando como referencia externa el tetrametilsilano ( $^1\text{H}$ ). Las constantes de acoplamiento se expresan en Hertzios (Hz) y como disolvente se usa  $\text{CDCl}_3$ .

#### Preparación de $[\text{AuCl}_2(\text{S}_2\text{C}=\text{NMe}_2)]$ (1) y $[\text{AuCl}_2(\text{S}_2\text{C}=\text{Bz}_2)]$ (2)

Para la preparación de estos compuestos, se parte de ditiocarbamato de metilo y de benzilo en su forma de sal sódica. Se pesa 1 mmol de cada uno de ellos (146 mg (Me) y 295 mg (Bz)) y se disuelven en matraces con 20 ml de agua destilada. Posteriormente, se añade gota a gota la sal de oro (III)  $\text{Na}[\text{AuCl}_4]$  (1 mmol; 398 mg), disuelta en agua. Se observa el cambio de color, desde más oscuro a más claro al mismo tiempo que la aparición de sólido. Las reacciones se dejan 24 h a temperatura ambiente, filtrando posteriormente los sólidos y secándolos con dietil éter.

1. **[AuCl<sub>2</sub>(S<sub>2</sub>CNMe<sub>2</sub>)](1)**: Sólido amarillo oscuro. Rendimiento = 80.7 %  
<sup>1</sup>H RMN (dmso-d<sub>6</sub>): δ 3.38 (6 H, singlete, Me)
2. **[AuCl<sub>2</sub>(S<sub>2</sub>CNBz<sub>2</sub>)](2)**: Sólido amarillo oscuro. Rendimiento = 68.5 %  
<sup>1</sup>H RMN (dmso-d<sub>6</sub>): δ 5.03 (2 H, doblete, CH<sub>2</sub>), 7.40 (5H, multiplete, Ph)

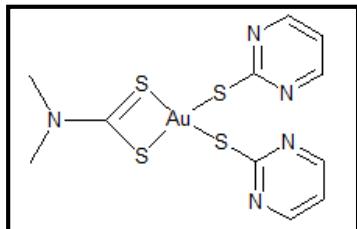
#### Preparación del complejo [Sn(Spirimidina)<sub>2</sub>Me<sub>2</sub>]

Se disuelven 2.5 mmoles de KOH en 20 ml de metanol. A continuación, se añaden 2 mmoles del tiolato (2-mercaptopirimidina) para deprotonarlo y se deja durante 15 minutos. Finalmente, se adiciona 1 mmol de SnCl<sub>2</sub>Me<sub>2</sub> y se deja la reacción durante 4 horas. Se produce la precipitación del correspondiente complejo en el medio de reacción y se obtiene un sólido de color blanco con un rendimiento de 81 %.

#### Preparación de [Au(Spirimidina)<sub>2</sub>(S<sub>2</sub>C =NMe<sub>2</sub>)] (3) y [Au(Spirimidina)<sub>2</sub>(S<sub>2</sub>C =NBz<sub>2</sub>)] (4)

En un matraz se disuelve el complejo [AuCl<sub>2</sub>(S<sub>2</sub>CNR<sub>2</sub>)] (0.25 mmol; (1) 97 mg (2) 135 mg) con 20 ml de acetona. A continuación, se añade el complejo [Sn(Spirimidina)<sub>2</sub>Me<sub>2</sub>] (0.25 mmol; 92 mg) y se deja la reacción en agitación durante 4 horas. Finalmente, se evapora al mínimo volumen y se precipita con dietil éter.

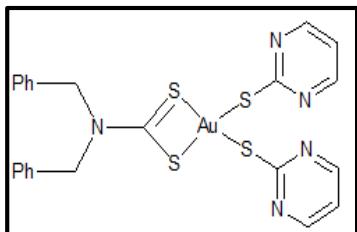
- **Au(Spirimidina)<sub>2</sub>(S<sub>2</sub>C =NMe<sub>2</sub>)] (3)**



Fórmula molecular:	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> AuN <sub>5</sub> S <sub>4</sub>
Peso molecular:	539.473 g/mol
Color:	Amarillo oscuro
Rendimiento:	73 %

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>): δ 8.3 (2H, d, *J*= 4.8 Hz), 6.79 (1H, t, *J*= 4.8 Hz), 3.29 (3H, s, Me (dtc)).  
IR: ν (N-CSS) 1541 cm<sup>-1</sup>, ν (SCS) 983 cm<sup>-1</sup>, ν (SAuS) 385,427 cm<sup>-1</sup>.

- **Au(Spirimidina)<sub>2</sub>(S<sub>2</sub>C =NBz<sub>2</sub>)] (4)**



Fórmula molecular:	C <sub>23</sub> H <sub>20</sub> AuN <sub>5</sub> S <sub>4</sub>
Peso molecular:	691.665 g/mol
Color:	Rojizo
Rendimiento:	54 %

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>): δ 8.3 (2H, d, *J*= 4.8 Hz), 7.34 (5H, m, Bz), 6.79 (1H, d, *J*= 4.8 Hz), 4.66 (2H, s, Bz). IR: ν (N-CSS) 1450 cm<sup>-1</sup>, ν (SCS) 976 cm<sup>-1</sup>, ν (SAuS) 317,420 cm<sup>-1</sup>.

## 2. ESTUDIOS BIOLÓGICOS

### 2.1. Cultivo celular

Los cultivos celulares son una de las principales herramientas utilizadas en biotecnología y proporcionan excelentes sistemas modelo para el estudio de la biología de las células, efectos de productos químicos y mutagénesis/carcinogénesis.

Toda manipulación que se realice con células eucariotas en cultivo ha de llevarse a cabo en **condiciones estériles**. Por ello, todos los experimentos se realizan en campana de flujo laminar vertical de clase II (Telstar AV-100), siguiendo el protocolo de trabajo existente en el laboratorio.

La línea celular utilizada en este estudio ha sido de carcinoma de colon humano, Caco-2, clones PD7 y TC7. Ambos clones están caracterizados por bajo consumo en glucosa y son funcionalmente iguales. Sin embargo se diferencian en su origen. Las células PD7 proceden de pasajes tempranos (30-40) y son heterogéneas y por el contrario, las células TC7 tienen su origen en pasajes tardíos (140-150), hecho que se refleja en su estabilidad y homogeneidad.

Las líneas celulares utilizadas se mantienen y se dejan crecer en una estufa de incubación (Haeraeus BB16) a una temperatura constante de 37 °C, y con una atmósfera humidificada con un 95% de O<sub>2</sub> y un 5% de CO<sub>2</sub>. A los 7 días de haber sido sembradas alcanzan la confluencia y su diferenciación a enterocitos normales, siendo máxima su actividad enzimática a los 15 días de haber alcanzado dicha confluencia.

Las células (pasajes 50-80) se crecen en un medio Dulbecco modificado (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 20%, aminoácidos no esenciales al 1%, penicilina (1000 U/ml) al 1%, estreptomicina (1000 µg/ml) al 1% y anfotericina (250 U/ml) al 1/‰.

Dado que las células Caco-2 son adherentes, su separación para una nueva siembra se lleva a cabo con un lavado con PBS y tratamiento con una solución de tripsina. Tras centrifugar 5 minutos a 3900 rpm se añade nuevo medio de cultivo al pellet de células y se procede a su conteo con azul tripán utilizando una cámara de Neubauer y un microscopio óptico. Posteriormente, se vuelven a sembrar en cantidad suficiente. La concentración de células viables en el cultivo (cél/ml) original se calcula del siguiente modo:

$$\text{cél/ml} = \text{Promedio recuento celular} \times 6 \text{ (dilución)} \times 10^4 \text{ (profundidad cámara Neubauer)}$$

### 2.2. Ensayo de viabilidad celular (MTT)

El ensayo MTT se basa en la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol o MTT, un compuesto incoloro, en azul de formazán por medio de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa. La cantidad de color que se detecta es directamente proporcional a la cantidad de células vivas.

Para realizar esta prueba, se siembran las células en una placa de 96 pocillos, con un total de 4.000 células por pocillo. Al día siguiente, se añaden diferentes concentraciones de los

complejos de oro en el rango 1.25-20  $\mu\text{M}$ , disueltos en medio de cultivo sin SFB. Como control o blanco se emplea una disolución de acetonitrilo al 0.2 % (disolvente inicial de los complejos de oro). Tras 72 horas de incubación, se añade a cada uno de los pocillos el reactivo MTT. Se incuban a 37°C durante 3-4 horas, posteriormente, se añade DMSO que solubiliza los cristales de azul de formazán, y se lee la densidad óptica de la placa a 540 nm en un espectrofotómetro.

### **2.3. Estudios de apoptosis**

Para determinar el tipo de muerte celular se han realizado ensayos de citometría de flujo. Se ha utilizado un citómetro que permite medir distintos parámetros de cada célula. Para estudiar una posible apoptosis se recurre a un marcaje con anexina V, que se une a la fosfatidil serina, compuesto que se encuentra en la cara interior de la membrana plasmática en células normales pero que se externaliza en caso de apoptosis. La anexina V va unida al fluorocromo FITC para permitir su detección.

Los ensayos se realizan en el Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA). Los experimentos comienzan con el lavado de las células con PBS, posteriormente se resuspenden en 100  $\mu\text{l}$  de buffer de unión a anexina V (10 mM Hepes/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>) y a continuación, se adicionan 5  $\mu\text{l}$  de anexina V-FITC y 5  $\mu\text{l}$  de PI a cada muestra. Se incuban 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y se añaden 400  $\mu\text{l}$  de buffer de unión a anexina V 1X. Se mide la intensidad de fluorescencia durante una hora con un FACSARIA BD y se analiza usando FACSDIVA BD.

### **2.4. Estudios de ciclo celular**

Conocer en qué punto del ciclo celular se produce la muerte de las células puede ser de mucha ayuda a la hora de determinar la diana sobre la que actúan los compuestos. Mediante citometría de flujo se determinan las células teñidas con un colorante fluorescente que se une al DNA, el ioduro de propidio (PI). Las células en proliferación darán lugar a una señal mayor. El PI emite fluorescencia a 620 nm.

El ensayo se realiza en el Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA). El procedimiento consiste en fijar las células en etanol al 70% enfriado con hielo y almacenarlas a 4°C durante 24 horas. Se centrifugan y se rehidratan con PBS, para después teñirlas con PI (50  $\mu\text{g/ml}$ ; la solución contiene RNasa A 100  $\mu\text{g/ml}$ ). El contenido de DNA de las células se analiza con un FACSARRAY BD equipado con un láser de iones de argón. El porcentaje de células en cada fase del ciclo celular se determina usando el software de verificación MODFIT 3.

## **3. ESTUDIOS DE INTERACCIÓN**

### **3.1. INTERACCIÓN CON DNA**

#### **3.1.1. Estudio de la interacción con el plásmido pIRES2-EGFP**

Este ensayo consiste en el estudio de la interacción del complejo  $[\text{Au}(\text{SPirimidina})_2(\text{S}_2\text{C}=\text{NMe}_2)]$  (3) con el plásmido pIRES2-EGFP (5308 pb), de la casa comercial Clontech. Para ello, se añade el volumen necesario de la disolución del metal recién preparada en agua miliQ. A continuación, se incuba 24 horas a 37 °C el plásmido ([3 nM]) con el complejo

de oro a distintas relaciones plásmido/ complejo (0.5, 1 y 2), y se compara con la incubación del mismo plásmido con el cisplatino. La movilidad de las muestras de pIRE52-EGFP tratadas con los complejos se analiza con la adición de Sybersafe mediante electroforesis de gel de agarosa al 1%, con el tampón TBE (0.5X) (Tris-borato/EDTA) 90 min a 50 V.

### 3.1.2. Estudio de la interacción con DNA en el tiempo

El DNA de Sigma Aldrich se rehidrata con una disolución de 5 mM Tris/HCl y 50 mM NaCl a pH= 7.2 y se guarda a 4 °C. La concentración real se confirma mediante espectroscopia visible (UV-vis) ( $\epsilon_{260\text{ nm}}= 6600\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ) obteniéndose un valor de 2090  $\mu\text{M}$ . A partir de ésta, se prepara una disolución de concentración 250  $\mu\text{M}$ . Además, se determina la pureza midiendo la relación de absorbancias ( $A_{280\text{ nm}} / A_{260\text{ nm}}$ ), y se obtiene un valor de 1.8 lo que indica que el DNA está puro.

Se prepara una disolución del complejo de oro en acetonitrilo de concentración 0.1 mM. Se añaden 10  $\mu\text{l}$  de esta solución, 470  $\mu\text{l}$  de la solución de DNA, y el resto hasta 3 ml del disolvente empleado (5 mM Tris/HCl y 50 mM NaCl a pH= 7.2). Esta reacción se lleva a cabo en una cubeta de 3 ml a 37 °C. La mezcla se resuspende y se mide el espectro de absorbancia cada 20 min durante 3 horas.

### 3.2. INTERACCIÓN CON ALBÚMINA SÉRICA BOVINA (BSA)

Se prepara una disolución con 0,5 gramos de BSA (de Sigma Aldrich) en 100 ml de PBS a pH= 7.4. La concentración real se confirma mediante espectroscopia visible ultravioleta (UV-vis) ( $\epsilon_{280\text{ nm}}= 43824\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ) siendo ésta de 540  $\mu\text{M}$ . Se utiliza el espectrofotómetro Thermo Scientific, con lámpara de Deuterio  $\lambda < 325$  y lámpara de Wolframio  $\lambda > 325$  y se mide en el rango de 200-500 nm. A partir de la disolución obtenida, se prepara otra de 50  $\mu\text{M}$ .

Se prepara una disolución del complejo de oro en acetonitrilo 2.5  $\mu\text{M}$ . Cada 4 minutos, se añaden 6  $\mu\text{l}$  de la solución 2.5  $\mu\text{M}$  del complejo de oro sobre la solución de BSA 50  $\mu\text{M}$  en una cubeta de cuarzo de longitud de paso óptico de 1 cm, con un volumen final de 3 ml. Las concentraciones finales del complejo de oro en la cubeta son: 5, 10, 15, 20, 25 y 30  $\mu\text{M}$ . El espectro de fluorescencia se realiza en el espectrofotómetro Jobin-Y von-Horiba fluorolog FL-3-11. Las muestras se excitan a 295 nm y el espectro de emisión se recoge en el rango entre 310- 450 nm. Las intensidades de fluorescencia de PBS y los complejos de oro son irrelevantes en las condiciones descritas.

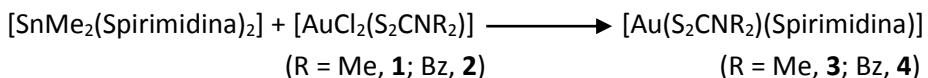
Los datos se analizan usando la ecuación de Stern-Volmer:  $F_0/F = 1 + K_{sv}[Q] = 1 + K_q\tau_0[Q]$ , donde  $F_0$  y  $F$  son las intensidades de fluorescencia de la BSA antes y después de la adición del complejo, respectivamente;  $K_{sv}$ , es la constante de *quenching* (desactivación) de Stern-Volmer,  $K_q$ , es la constante bimolecular de desactivación,  $[Q]$  es la concentración del agente desactivador (en este caso, el complejo de oro), y  $\tau_0$  es el tiempo de vida de fluorescencia de la especie emisora. La gráfica de  $F_0/F$  vs  $[Q]$  nos da el valor de  $K_{sv}$ . La constante de enlace ( $K_b$ ) se determina usando la ecuación modificada de Stern-Volmer:  $\log\{(F_0/F)/F\} = \log K_b + n\log [Q]$ , donde  $n$  es el número de sitios de unión.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se analizan y discuten los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, relacionados con la síntesis y caracterización de los complejos de oro (III) con ditiocarbamatos como ligandos, y con el estudio de su posible actividad anticancerígena.

### 1. SÍNTESIS DE LOS COMPLEJOS $[\text{Au}(\text{SPirimidina})_2(\text{S}_2\text{C}=\text{NR}_2)]$

La síntesis de los complejos de oro (III) con ligandos del tipo ditiocarbamato y tiolato se ha llevado a cabo mediante reacciones de transmetalación (ecuación 1). Esta reacción consiste en la transferencia de un ligando presente en otro centro metálico al oro. Se justifica el empleo de estas reacciones por la inestabilidad de los complejos de oro (III) en presencia de un medio básico, necesario para deprotonar el ligando tiolpirimidina.

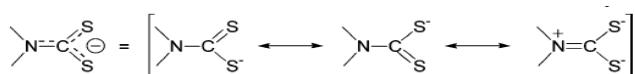


*Ecuación 1. Reacción de transmetalación.*

Dada la amplia experiencia del grupo de investigación en el que se ha llevado a cabo este trabajo en reacciones de transmetalación con complejos de estaño hacia centros de oro (I) y oro(III)<sup>19</sup>, se emplean complejos tiolato de estaño(IV) como productos de partida para transferir los ligandos tiolato a los centros de oro(III).

El procedimiento para la síntesis de los compuestos necesarios está explicado en la parte experimental de este trabajo. La caracterización se realiza por espectroscopia infrarroja y <sup>1</sup>H RMN en disolución de CDCL<sub>3</sub>.

En el **espectro IR** (ver anexos) se observan las bandas características de los ditiocarbamatos. En la región 1450-1580 aparece una banda asociada a la vibración  $\nu(\text{N}-\text{CSS})$ , banda que define el orden de enlace N-C, que es intermedio entre un enlace sencillo (1250-1350 cm<sup>-1</sup>) y uno doble (1640-1690 cm<sup>-1</sup>). La presencia de una sola banda indica la presencia de 3 posibles estructuras resonantes (figura 10). La región entre 940-1060 cm<sup>-1</sup> se asigna a la vibración  $\nu_a$  (SCS). También se distinguen las bandas que corresponden a la coordinación del metal con el átomo de azufre  $\nu(\text{S}-\text{Au}-\text{S})$ , que aparecen dos en torno a 350 y 420 cm<sup>-1</sup>.



*Figura 10. Formas resonantes del Ditiocarbamato.*

En el **espectro <sup>1</sup>H RMN** (ver anexos) se observan las señales de protones correspondientes a las dos moléculas de tiol pirimidina, que son equivalentes. La primera señal aparece como un triplete, en torno a 6.7 ppm en ambos complejos y la segunda corresponde a un doblete alrededor de 8.3 ppm, que integra por 2 protones. La primera señal corresponde al protón central de la pirimidina, y la segunda a los otros dos protones (equivalentes) vecinos, ya que los protones que resuenan a desplazamientos mayores son los más cercanos a los nitrógenos ya que éstos retiran densidad electrónica, y desapantan. En el complejo **3**, la señal de los metilos del ligando ditiocarbamato aparece como un singlete a 3.29 ppm, y está

integrada por 3 protones. En el complejo **4**, los grupos benzilo del ditiocarbamato aparecen como dos señales, un singlete a 4.66 ppm, que integra por 2 protones, y que corresponden al grupo  $-\text{CH}_2-$ ; y un multiplete centrado en 7.34 ppm integrado por 5 protones que corresponden al fenilo.

## 2. ESTUDIOS BIOLÓGICOS

Los experimentos *in vitro* son necesarios en el desarrollo preclínico de nuevos fármacos. En este apartado se analizan los resultados obtenidos con los complejos descritos previamente, en estudios farmacocinéticos y toxicológicos en la línea celular de adenocarcinoma de colon humano Caco-2.

### 2.1. ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS

Mediante los estudios farmacocinéticos como el ensayo MTT descrito en la parte experimental, se obtiene el valor de  $\text{IC}_{50}$ , medida de la efectividad de un determinado compuesto en la inhibición de una función bioquímica o biológica. Este valor indica la cantidad de compuesto necesaria para inhibir un proceso a la mitad, en este caso, se refiere a la concentración de compuesto necesaria para reducir a la mitad la concentración de células responsables del cáncer estudiado.

En general, para los posibles candidatos con fines terapéuticos se buscan los que presentan menos efectos secundarios, lo que conlleva una concentración baja del mismo. Por tanto, son de más interés aquellos compuestos con valores bajos de  $\text{IC}_{50}$  ( $\mu\text{M}$ ) ya que cuanto menor sea el valor, menor será la dosis necesaria para conseguir reducir a la mitad el número de células cancerígenas.

Antes de realizar el MTT, las células se observan en el microscopio óptico y se aprecian cambios morfológicos propios del proceso de apoptosis que sufren tras 72 horas de incubación con el compuesto. Algunos de estos cambios son: disminución del tamaño, aislamiento respecto a las células limitantes y reordenamiento de su forma. En la tabla 1 se recoge la media del  $\text{IC}_{50}$  junto con la desviación típica de los tres experimentos de MTT realizados para cada uno de los clones.

Compuesto	Células	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
<chem>[Au(Spirimidina)2(S2C=NMe2)](3)</chem>	PD7	$1.27 \pm 0.69$
	TC7	$3.438 \pm 2.26$

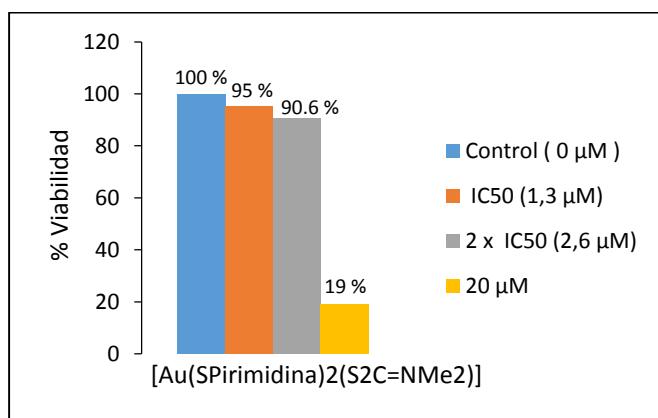
**Tabla 1.** Resultados  $\text{IC}_{50}$  del ensayo MTT en células Caco-2/PD7-TC7 tras 72 h de incubación con el complejo [Au(Spirimidina)2(S2C=NMe2)](3).

En el compuesto **3** se pueden observar diferencias entre los clones TC7 y PD7. A pesar de la diferencia, el valor que se observa es relativamente bajo por lo que podría ser buen candidato como fármaco anticancerígeno ya que inhibe eficazmente el crecimiento celular. Además, el valor del  $\text{IC}_{50}$  es inferior al que se puede obtener con el cisplatino ( $\text{IC}_{50} = 45.6 \pm 8.08$ ; estudiado con anterioridad en el laboratorio).

En el caso del complejo **4**, al analizar las placas de células tratadas con él, se observa una cierta descomposición del mismo, esto podría ser debido a su escasa estabilidad en condiciones fisiológicas. Por esta razón, este compuesto de oro (III) quedaría descartado, en principio, como posible fármaco anticancerígeno. Por ello, este complejo se deja de ensayar en los estudios posteriores.

La línea celular Caco-2 es la única capaz de desarrollar una diferenciación espontánea completa de tipo endocitario al llegar a la confluencia. Esta característica permite estudiar la toxicidad de los compuestos en células diferenciadas (no cancerígenas).

Las células Caco-2 diferenciadas se tratan con distintas concentraciones del compuesto en estudio ( $IC_{50}$ ,  $2 \times IC_{50}$ , y  $20 \mu M$ ), y tras 72 horas de incubación, se lleva a cabo el ensayo de MTT obteniendo los porcentajes de viabilidad representados en la figura 11.



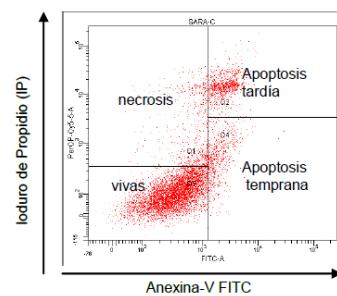
**Figura 11.** Porcentajes viabilidad células diferenciadas Caco-2 tras 72 horas de incubación a distintas concentraciones del compuesto 3 ( $IC_{50}$ ,  $2 \times IC_{50}$ , y  $20 \mu M$ ).

Como se puede apreciar en la figura 11, sólo a concentraciones elevadas del compuesto **3** ( $20 \mu M$ ), se observa un efecto *per se* sobre los enterocitos. Estos resultados podrían servir como una primera aproximación de los escasos efectos secundarios de este compuesto, siendo éstos probablemente leves, dado que no afectan prácticamente a células no cancerígenas a concentraciones de  $IC_{50}$  y del doble de  $IC_{50}$ . Tal y como se muestra en la representación, a dichas concentraciones se observa un 95 y 90,6% de viabilidad celular, tras 72h de incubación con el complejo metálico.

## 2.2. ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS: Apoptosis y Ciclo Celular

### 2.2.1 Apoptosis

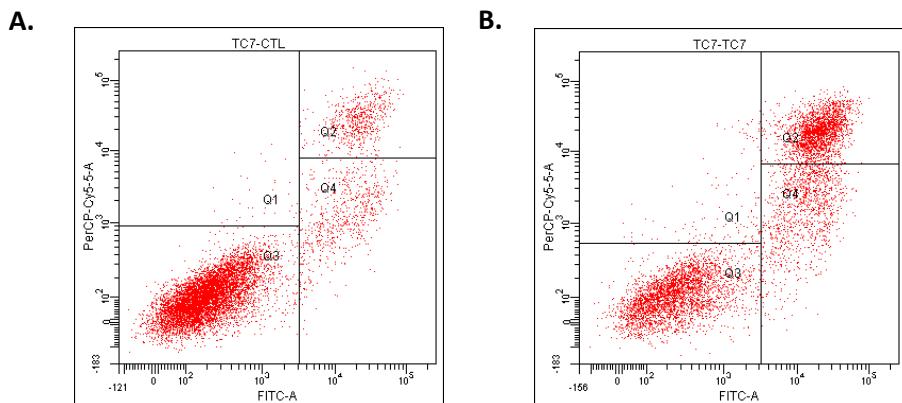
Existen varias técnicas para determinar la apoptosis celular como electroforesis de DNA o citometría de flujo. En este caso, se realiza mediante citometría de flujo como se explica en la parte experimental. Para ello, se utilizan como marcadores Ioduro de Propidio (IP) y anexina V, lo que permite la diferenciación de las células viables, de las apoptóticas tempranas, las apoptóticas tardías y las necróticas<sup>20</sup> (Figura 12).



**Figura 12.** Histograma Anexina V/IP.

Las células cancerígenas, en general, muestran una proliferación celular descontrolada a causa de la inhibición de los procesos apoptóticos. En este apartado, se evalúa la tendencia que tiene el complejo de oro (III) a inducir la muerte celular programada o apoptosis.

Las células Caco-2 se tratan con el complejo de oro (III) a la concentración del  $IC_{50}$  y tras 24 horas de incubación, se obtienen los resultados mostrados en la figura 13 y tabla 2.



**Figura 13.** Caco-2. A. Control. B. Complejo  $[Au(Spirimidina)_2(S_2C=NMe_2)]$ :  $IC_{50}$ .

Compuesto	% Vivas	% Muertas		
		% Necrosis	% Apoptosis temprana	% Apoptosis tardía
Control	85.6	0.4	7.3	6.7
$[Au(Spirimidina)_2(S_2C=NMe_2)]$ (3)	48.5	2.0	17.1	<b>32.5</b>

**Tabla 2.** Porcentajes de células vivas y muertas obtenidos a partir de la figura 13.

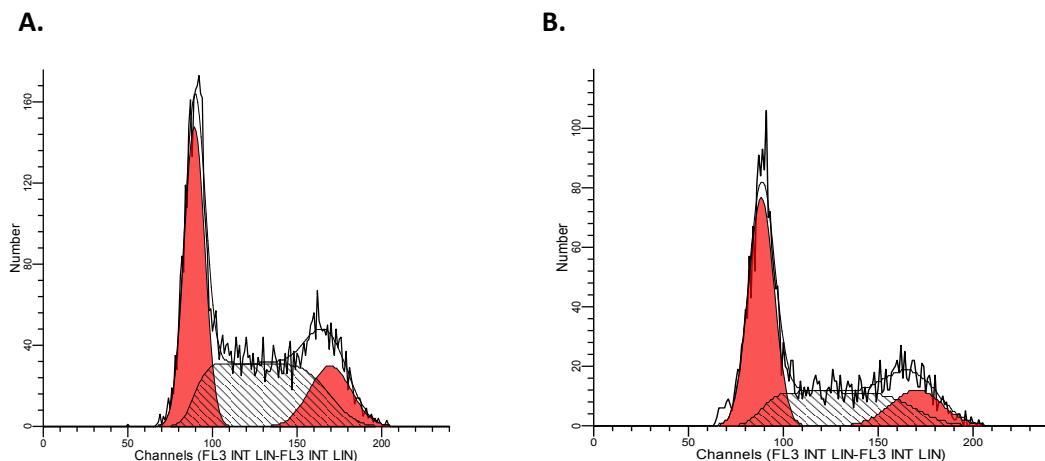
Si se comparan los resultados entre el control y el complejo sintetizado, se puede apreciar una clara inducción de apoptosis, siendo aproximadamente la apoptosis tardía 5 veces mayor que el control, y la apoptosis temprana algo más de 2 veces. A pesar de que en la muestra del complejo hay un porcentaje de células vivas bastante alto, la suma de la apoptosis temprana y de la apoptosis tardía da un valor mayor al porcentaje de células vivas. Para conseguir mayor eficacia, tal vez se podría alargar el tiempo de incubación a 72 horas como se hizo en el estudio del MTT. No obstante, nuestro interés se centró en ensayar con un tiempo menor para descartar una posible necrosis.

El hecho de que el complejo presente un porcentaje de apoptosis tardía superior al de apoptosis temprana hace pensar, *a priori*, que se trata de un buen candidato como posible fármaco anticancerígeno. Además, muestra un porcentaje muy bajo de necrosis, del 2 %, requisito fundamental del candidato, ya que interesa que produzca una muerte de las células cancerígenas por apoptosis y no por necrosis, evitando de esta forma un proceso inflamatorio.

### 2.2.2 Ciclo Celular

Uno de los objetivos de la quimioterapia es atacar a las células cancerígenas durante una o más fases de su ciclo reproductivo. Hay una considerable evidencia de que el daño en el DNA provocado por fármacos como el cisplatino altera la progresión del ciclo celular. En concreto, las células cancerígenas tratadas con este quimioterapéutico se detienen en el ciclo celular en la fase G<sub>2</sub>/M, inhibiendo la división celular.

El ensayo se realiza con células indiferenciadas Caco-2 tratadas con el complejo sintetizado,  $[\text{Au}(\text{SPirimidina})_2(\text{S}_2\text{C}=\text{NMe}_2)]$  (**3**), a la concentración de IC<sub>50</sub> y se incuban durante 24 horas.



**Figura 14.** Caco-2. A. Control. B. Complejo  $[\text{Au}(\text{SPirimidina})_2(\text{S}_2\text{C}=\text{NMe}_2)]$ : IC<sub>50</sub>.

Muestra	G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub>
Control	39.70 %	44.13 %	16.18%
$[\text{Au}(\text{SPirimidina})_2(\text{S}_2\text{C}=\text{NMe}_2)]$ ( <b>3</b> )	49.09 %	35.37%	15.54%

**Tabla 3.** Porcentajes en las fases del ciclo celular de la figura 14.

Analizando los datos, se puede observar que tras la incubación de las células con el complejo **3**, el porcentaje de células en la fase G<sub>1</sub> se ve aumentado, a costa de la disminución de células en las fases S y G<sub>2</sub>. Este hecho podría indicar un posible arresto del ciclo en la fase G<sub>1</sub>, lo que disminuye la progresión de las células hacia las siguientes etapas.

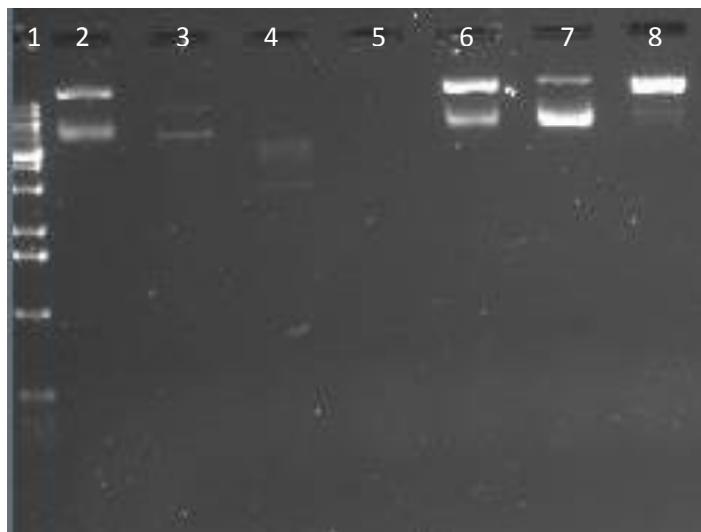
Sin embargo, mediante este estudio no se puede asegurar si existe o no interacción de los compuestos sintetizados con el DNA de las células. Si esta interacción ocurriera, aparecería competencia directa entre el Ioduro de Propidio y el compuesto, de modo que podrían verse alterados los histogramas.

### 3 ESTUDIOS DE INTERACCIÓN CON DNA

El mecanismo de acción de los complejos de oro (III) sigue siendo desconocido, pero una de las posibles dianas es el DNA, en lo que se centra el estudio en esta sección.

#### 3.1. Estudio de la interacción con el plásmido pIRES2-EGFP

En este ensayo se estudia la interacción con el plásmido pIRES2-EGFP mediante electroforesis en gel de agarosa como se detalla en la parte experimental. Los resultados de la movilidad de las muestras tratadas con el complejo de oro (III) y cisplatino se muestran en la figura 15.

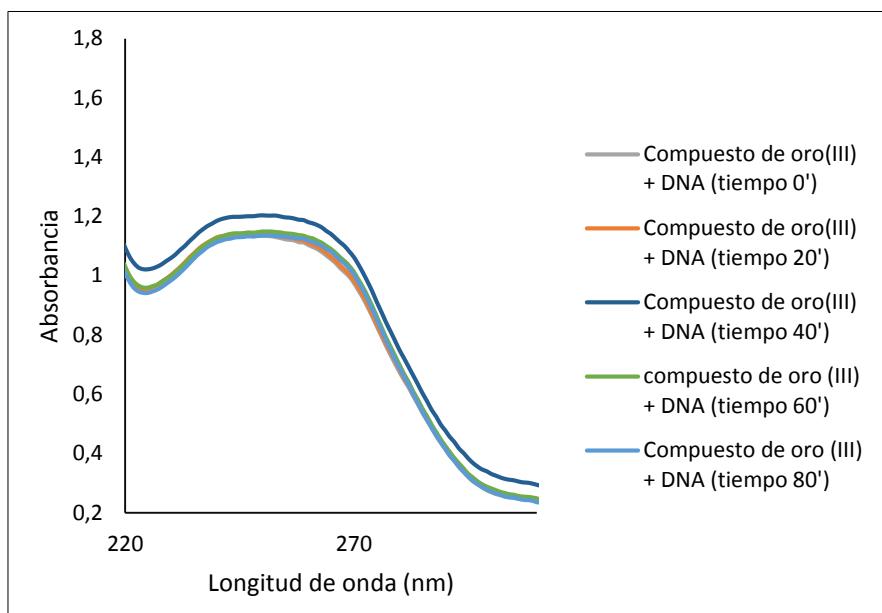


**Figura 15.** Gel de electroforesis. Carriles: 1. Marcador de pesos moleculares. 2. Control: plásmido + H<sub>2</sub>O. 3. Cisplatino/Plásmido: 0.5:1. 4. Cisplatino/Plásmido: 1:1. 5. Cisplatino/Plásmido: 2:1. 6. Complejo de oro/Plásmido: 0.5:1. 7. Complejo de oro/ Plásmido: 1:1. 8. Complejo de oro/Plásmido: 2: 1.

Como se puede observar, en el carril del control aparecen dos bandas: la superior, que corresponde a la conformación circular del plásmido, y la inferior que constituye la forma superenrollada del mismo. Si se compara el control con los carriles del complejo, se observa que las bandas se encuentran a la misma altura independientemente de la proporción de plásmido/complejo, lo que descarta que se haya producido interacción entre el derivado y el plásmido. Sin embargo, si se observan los carriles 3 y 4, del cisplatino, que se sabe que interacciona con el DNA, se aprecia una modificación de las bandas tanto en posición como en intensidad, debido a la interacción entre el DNA y cisplatino.

#### 3.2 Estudio de la interacción con DNA en el tiempo

En este ensayo, la interacción del complejo de oro (III) con el DNA se estudia por espectroscopia UV-Vis a diferentes tiempos (figura 16) como se explica en la parte experimental. Experimentos similares llevados a cabo con cisplatino<sup>21</sup> muestran un efecto de hipercromismo, acompañado de un desplazamiento de la absorbancia con el transcurso del tiempo, lo cual supone una interacción entre los pares de bases del DNA con la molécula de cisplatino.



**Figura 16.** Espectro Vis-Uv (220- 310 nm).  $[DNA]= 0.25 \text{ mM}$ ,  $[Au(Spirimidina)_2(S_2C=NMe_2)]= 0.1 \text{ mM}$ .

En la figura 16 no se observa un aumento de la absorbancia con el tiempo, solo un pequeño incremento en el espectro de 40 minutos. Este cambio es debido a que se aumentó la temperatura (de 25 °C a 37 °C) en ese período para determinar si el incremento de temperatura favorecía la interacción entre el complejo y el DNA. Sin embargo, lo que parecía apuntar que sí que contribuía, no era así ya que en los siguientes minutos se observa cómo se vuelve a la absorbancia inicial. Este experimento corrobora el resultado anterior mediante electroforesis en gel de agarosa. Por ello, podríamos asegurar que el mecanismo de acción es diferente al del cisplatino, y que el DNA no constituye la diana principal de este complejo de oro (III), ya que su interacción con el DNA parece ser muy débil o inexistente.

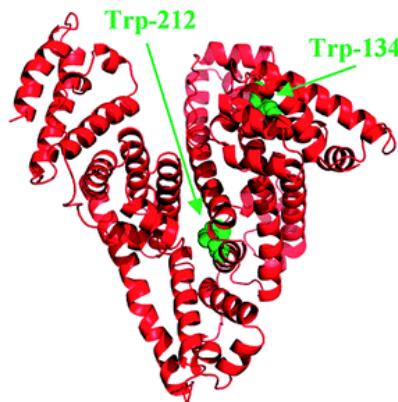
#### 4 ESTUDIO DE INTERACCIÓN CON BSA (Albúmina sérica bovina)

La albúmina sérica bovina es la proteína más abundante del plasma y es considerada como modelo de proteínas globulares, además es una de las más estudiadas debido a su estructura similar con la albúmina sérica humana (HSA). Las albúminas cumplen muchas funciones fisiológicas como: contribuir al mantenimiento de la presión osmótica y pH en sangre, proteger frente al estrés oxidativo,... Además, son capaces de unirse reversiblemente a una amplia variedad de ligandos tanto endógenos como exógenos, incluyendo varios iones metálicos.

Dado que la mayor parte de los fármacos anticancerígenos son administrados de forma intravenosa, el estudio de su posible interacción con componentes de la sangre es de especial interés. La interacción con proteínas séricas determina a grandes rasgos, la distribución y eliminación, así como diferencias en eficacia, actividad y toxicidad. En general, el metabolismo de un fármaco puede ser significativamente alterado por la unión a proteínas séricas. Además, está cobrando cada vez más importancia porque el paradigma de que el DNA es la principal diana de los complejos antitumorales de oro (III) está decayendo, y está siendo sustituido por el interés en las proteínas como posible mecanismo de acción.

La BSA está formada por una cadena de 580 aminoácidos con una estructura constituida por tres dominios. Los triptófanos 134 y 212, pertenecientes al primer y segundo dominio, respectivamente, muestran fluorescencia intrínseca<sup>22</sup>(figura 17). El triptófano es

altamente sensible a su entorno, pudiendo observarse cambios en el espectro de emisión de fluorescencia en el caso de modificaciones conformativas de la proteína o unión a sustratos. Se conoce como desactivación y es un método que permite estudiar las interacciones de la proteína con los sustratos gracias a su alta sensibilidad y rápida respuesta.



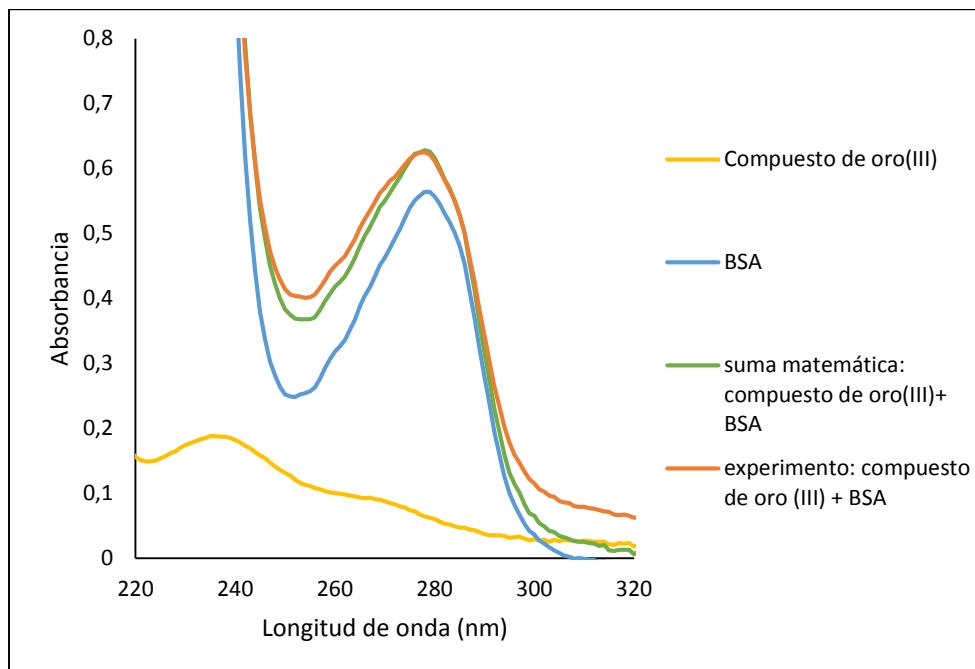
**Figura 17.** Estructura BSA y localización de los triptófanos 134 y 212.

El fenómeno de desactivación de fluorescencia se refiere a procesos que provocan una disminución de la intensidad de fluorescencia de una sustancia dada. Esta desactivación puede ser resultado de varios mecanismos. Estos mecanismos incluyen reacciones de los estados excitados, transferencia de energía, formación de complejos y desactivación por colisiones.

Los diferentes mecanismos de desactivación de la fluorescencia se clasifican en: “desactivación colisional o dinámica”, cuando la desactivación es resultado de los choques entre moléculas, y “desactivación estática”, cuando es el resultado de formación de complejos.

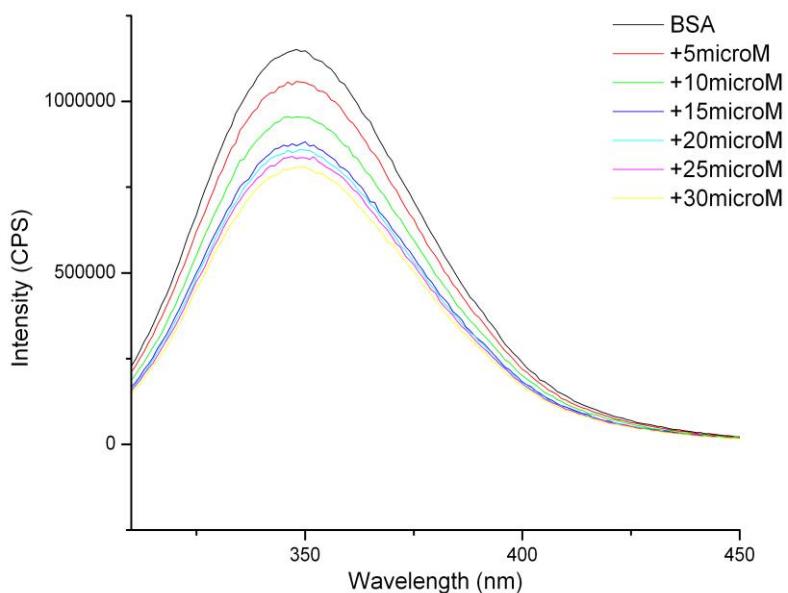
En primer lugar, se realiza un espectro de absorción en UV-Vis, método simple y efectivo que permite observar el cambio estructural y detectar la formación del complejo. Para ello, se miden individualmente los espectros de la BSA y del complejo de oro, y otro conjunto BSA-complejo de oro a concentraciones de 10  $\mu$ M. Además, se calcula la suma matemática de los espectros individuales de la BSA y del complejo de oro para ver si se asemeja al espectro conjunto.

Los espectros se encuadran en el rango de 220-320 nm. Como se observa en la figura 18, la intensidad de absorbancia de la BSA aumenta con la presencia del complejo de oro comparado con la ausencia del mismo, lo que indica la formación de un complejo. Además, el espectro conjunto BSA-complejo de oro es bastante similar a la suma matemática de los espectros individuales, lo que apunta a un mecanismo de desactivación estático.



**Figura 18.** Espectro Vis-Uv (220-320).  $[BSA] = [Au(Spirimidina)_2(S2C=NMe_2)] = 10 \mu M$ .

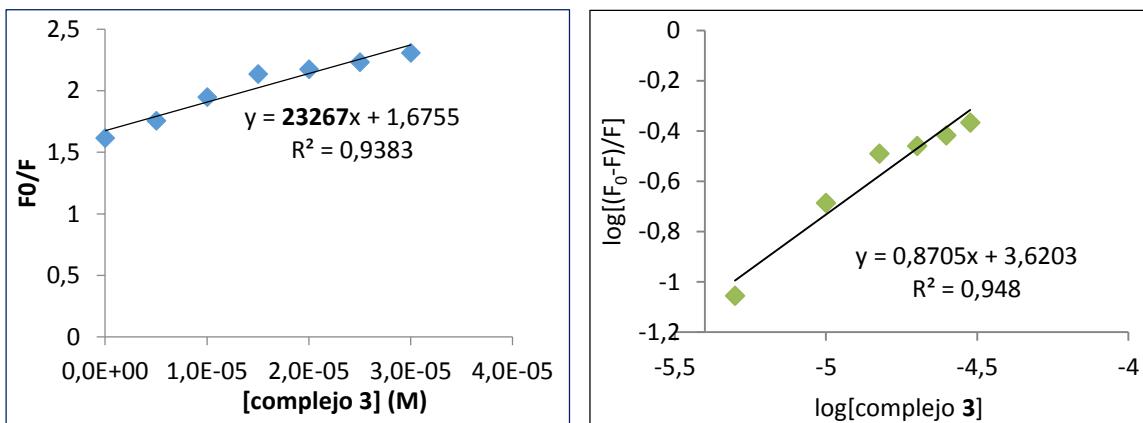
Para confirmar la interacción entre la BSA y el derivado metálico y para obtener una constante de unión, se mide la fluorescencia de la BSA en el rango de 310-450 nm como se describe en el apartado experimental, bajo una excitación de 290 nm y en presencia de cantidades variables del complejo **3**. Cuando se excita la BSA a 295 nm se observa una emisión en torno a 350 nm que procede exclusivamente de los triptófanos. La disminución de la intensidad de dicha emisión, conocida como desactivación o quencheo, permite determinar experimentalmente la interacción del agente externo con la BSA.



**Figura 19.** Desactivación de la señal de la BSA tras sucesivas adiciones del complejo **3**.

A medida que aumenta la concentración del complejo, disminuye la señal de intensidad de fluorescencia, sin producirse ningún cambio en el pico máximo de emisión o en la forma del espectro (figura 19). Esta desactivación de la fluorescencia indica que el entorno del cromóforo de la proteína BSA cambia al añadir este complejo metálico.

Los datos de intensidad de fluorescencia se analizan de acuerdo a la ecuación de Stern-Volmer (descrita en detalle en la parte experimental), y a partir de las gráficas recogidas en la figura 20 se calcula la constante de unión ( $K_b$ ), y la constante de desactivación de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ).



**Figura 20.** Gráficas de Stern-Volmer para la desactivación de la señal de la BSA tras adiciones del complejo  $[\text{Au}(\text{SPirimidina})_2(\text{S}_2\text{C}=\text{NMe}_2)](3)$ . Ecuaciones usadas:  
Gráfica izquierda  $\rightarrow F_0/F = 1 + K_{sv} [\text{complejo 3}]$ . Gráfica derecha  $\rightarrow \log\{F_0-F/F\} = \log K_b + n \log[\text{complejo 3}]$ .

Compuesto	$K_{sv} (\text{M}^{-1})$	$K_b (\text{M}^{-1})$
$[\text{Au}(\text{SPirimidina})_2(\text{S}_2\text{C}=\text{NMe}_2)](3)$	$2.33 \cdot 10^4$	$4.17 \cdot 10^3$

**Tabla 4.** Valores de  $K_{sv} (\text{M}^{-1})$  y  $K_b (\text{M}^{-1})$  para el complejo 3.

El valor obtenido para la constante de unión está en el rango de  $10^3$ . Este valor es próximo al observado en el cisplatino,  $K_b$  de  $8.52 \cdot 10^2$  con la albúmina sérica humana<sup>23</sup>. Valores más elevados, en torno a  $10^{10}$ , se observan en el caso de nanopartículas de oro<sup>24</sup> lo que indica una interacción más fuerte con la proteína. Valores por debajo de 1 de  $n$  (en este caso,  $n=0.8705$ ), indican que hay aproximadamente un solo tipo de sitio de unión en la BSA para el complejo de oro.

La unión con la BSA es importante para el transporte de fármacos. Sin embargo, si la interacción es muy fuerte, el fármaco puede no ser liberado en su diana. El valor intermedio de la  $K_b$  para el complejo 3, podría indicar que puede ser transportado por esta proteína en el cuerpo y fácilmente liberado en su diana.

Una gráfica de Stern-Volmer  $F_0/F$  vs  $[\text{complejo}]$  lineal (figura 20) es indicativa de un solo tipo de mecanismo de desactivación, pudiendo ser estático o dinámico. Teniendo en cuenta el espectro de absorción en UV-Vis, donde apunta a la formación de un complejo, y por tanto, desactivación estática, se podría predecir que se trata de un mecanismo estático y no dinámico. Para corroborarlo se podrían realizar otras medidas como los tiempos de vida de fluorescencia o el efecto de la temperatura en la interacción.

## CONCLUSIONES

1. El uso de reacciones de transmetalación a partir de complejos de estaño (IV) ha permitido la preparación de complejos de oro (III) con ligandos ditiocarbamato y tiolato de forma efectiva. Dichos compuestos han sido caracterizados mediante espectroscopia infrarroja y resonancia magnética nuclear.
2. El complejo **[Au(Spirimidina)<sub>2</sub>(S<sub>2</sub>C=NMe<sub>2</sub>)]** (3) ha mostrado una elevada citotoxicidad *in vitro* frente a células de cáncer de colon humano. A partir de los ensayos de MTT se ha determinado un valor del IC<sub>50</sub> de 1.27 μM en el clon PD7 y de 3.438 μM en TC7. A pesar de la diferencia en ambos clones, el valor del IC<sub>50</sub> es inferior al del cisplatino (IC<sub>50</sub> = 45.6), por lo que el complejo sintetizado es más efectivo a concentraciones más bajas, y por lo tanto podría resultar menos tóxico.
3. El complejo **[Au(Spirimidina)<sub>2</sub>(S<sub>2</sub>C=Nbz<sub>2</sub>)]** (4) no ha podido ser estudiado *in vitro* al mostrar descomposición en el medio de cultivo, debida a una reducida estabilidad en condiciones fisiológicas, lo que ha llevado a generar oro metálico en tales condiciones.
4. Los ensayos en las células diferenciadas de tipo endocitario han permitido estudiar la toxicidad del complejo. Tras 72 horas de incubación, se obtienen viabilidades cercanas al 100 % en las células tratadas con el valor IC<sub>50</sub>, y con el doble del IC<sub>50</sub>, por lo que los efectos secundarios se intuyen leves, mientras que a concentraciones mayores, de 20 μM, se observa una mayor toxicidad.
5. Respecto a los estudios toxicológicos, las células tratadas durante 24 horas con el complejo muestran una clara inducción de apoptosis tardía junto con un porcentaje bajo de necrosis, evitando de esta forma el proceso inflamatorio. Además, el ciclo celular se ve alterado, con un aumento en la fase G<sub>1</sub> y disminución en las fases S y G<sub>2</sub>, por lo que se impide la progresión en el ciclo. Estudios posteriores son necesarios para determinar cuál es el mecanismo de acción.
6. Los estudios de interacción con el DNA muestran una unión muy débil del complejo, además esta interacción no aumenta con el tiempo ni con la temperatura. Por esta razón, se podría asegurar que el mecanismo de acción es diferente al del cisplatino y que el DNA no constituye la diana principal de este complejo de oro (III).
7. A partir de los ensayos de interacción del complejo **[Au(Spirimidina)<sub>2</sub>(S<sub>2</sub>C=NMe<sub>2</sub>)]** (3) con la BSA, se determina un valor de  $4.17 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$  para la constante K<sub>b</sub>, lo que indica que el complejo puede ser transportado por esta proteína en la sangre y fácilmente liberado en su órgano diana.

En resumen, se podría decir que el complejo **[Au(Spirimidina)<sub>2</sub>(S<sub>2</sub>C=NMe<sub>2</sub>)]** (3) puede llegar a ser un buen candidato a fármaco anticancerígeno por su elevada citotoxicidad, escasos efectos secundarios, inducción de apoptosis tardía, arresto en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular y transporte adecuado en el organismo gracias a la unión con la BSA.

## CONCLUSIONS

1. The use of transmetalation reactions from tin (IV) complexes has allowed an effective synthesis of gold (III) complexes with dithiocarbamato ligands and thiolate. These complexes have been characterized through infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance.
2. The complex **[Au(Spirimidina)<sub>2</sub>(S<sub>2</sub>C=NMe<sub>2</sub>)] (3)** has shown a high citotoxicity *in vitro* against human colon cancer cells. The IC<sub>50</sub> value has been determinated from MTT assays, being 1.27 μM in PD7 clone and 3.438 μM in TC7 clone. Despite the difference, the IC<sub>50</sub> is lower than the one from cisplatin (IC<sub>50</sub> = 45.6). Thus, the synthetized complex is more effective at lower concentrations, so, it could be less toxic.
3. The complex **[Au(Spirimidina)<sub>2</sub>(S<sub>2</sub>C=NBz<sub>2</sub>)] (4)** cannot be studied *in vitro* because of its decomposition in the culture medium, due to a limited estability under physiological conditions, which leads to generate metallic golden in these conditions.
4. The toxicity of the complex has been studied in assays with differenciate cells. After 72 hours of exposure to the drug, viabilities close to 100 % have been obtained in cells treated with IC<sub>50</sub> value and with two times IC<sub>50</sub> value. For this reason, it might have mild side effects, nevertheless, there is a higher toxicity at higher concentrations (20 μM).
5. In relation to toxicological studies, cells treated during 24 hours with the drug show a late apoptosis induction combined with a low percentage of necrosis, avoiding an inflammatory process. In addition, the cell cycle is modified, showing an increase of the celular population in the G<sub>1</sub>-phase with a concomitant decrease in S and G<sub>2</sub> phases, inhibiting the progression through the cell cycle. Further studies are needed to explain the mechanism of action.
6. DNA binding studies have shown a weak interaction with the complex, besides, this interaction does not increase with time or temperature. For this reason, it could be said that the complex exhibits a non-cisplatin-like mechanism of action and that DNA does not constitute the main target of this gold (III) complex.
7. From the interaction assays between BSA and the complex **[Au(Spirimidina)<sub>2</sub>(S<sub>2</sub>C=NMe<sub>2</sub>)] (3)**, a value of 4.17 ·10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup> is obtained for the binding constant (K<sub>b</sub>). The moderate value could indicate that the complex can be stored and carried by this protein in the body and be easily released to the target.

All in all, it could be said that the complex **[Au(Spirimidina)<sub>2</sub>(S<sub>2</sub>C=NMe<sub>2</sub>)] (3)** can lead to a good candidate as an anticancer drug considering its high citotoxicity, limited side effects, late apoptosis induction, G<sub>1</sub>-phase arrest during the cell cycle, and an appropriate transport through the body thanks to BSA binding.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Alberts, Bruce. Introducción a la Biología Celular. Ed. Panamericana. México. **2011**.
2. Cooper, Geoffrey M.; Hausman, Robert E. La célula. Ed Marbán. Madrid. **2011**.
3. T. Andre, C. Boni, L. Mounedji-Boudiaf, M. Navarro, J. Tabernero, T. Hicklish, C. Topham, M. Zaninelli, P. Clingan, J. Bridgewater, I. Tabah-Fisch, A. de Gramont. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N. Engl. J. Med.* **2004**, 350 (23), 2343-2351.
4. M.D. Esposti. Mitochondria in apoptosis: past, present and future. *Biochem. Soc. Trans.* **2004**, 32, 493-495.
5. A. H. Wyllie, J.F. Kerr, A.R. Currie. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev. Cytol.* **1980**, 68, 251-306.
6. B. Rosenberg, L. Van Camp, J. E. Trosko, V. H. Mansour. Platinum compounds; a new class of potent antitumor agents. *Nature*. **1969**, 222, 385-396.
7. P. C. Bruijnincx, P. J. Sadler. New trends for metal complexes with anticancer activity. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, 12(2), 197-206.
8. N. Muhammad, Z. Guo. Metal-based anticancer chemotherapeutic agents. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, 19, 144-153.
9. R. Koch. Über bacteriologische forschung. *Dstch. Med. Wochenschr.* **1890**, 16, 756-757.
10. S. P. Fricker. Medical chemistry and pharmacology of gold compounds. *Transit. Metal. Chem.* **1996**, 21, 377-383.
11. L. Ronconi, C. Marzano, P. Zanello, M. Corsini, et al. Gold (III) dithiocarbamate derivates for treatment of cancer: solution chemistry, DNA binding, and hemolytic properties. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 1648-1657.
12. L. Messori, G. Marcon. Gold complexes as Antitumor agents. *Met. Ions. Biol. Syst.* **2004**, 42, 385-424.
13. L. Giovagnini, L. Ronconi, D. Aldinucci, D. Lorenzon, S. Sitran, D. Fregona. Synthesis, Characterization, and Comparative in Vitro Cytotoxicity Studies of Platinum (II), Palladium (II), and Gold (III) Methylsarcosinedithiocarbamate Complexes. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 1588-1595.
14. I. Ott. On the medicinal chemistry of gold complexes as anticancer drugs. *Coord. Chem. Rev.* **2009**, 253, 1670-1681.
15. A. Brindoli, M.P. Rigobello, G. Scutari, C. Gabbiani, A. Casini, L. Messori. Thioredoxin reductase: a target for gold compounds acting as potential anticancer drugs. *Coord. Chem. Rev.* **2009**, 253, 1692-1707.
16. D. Saggioro, MP Rigobello, L. Paloschi, A. Folda, SA Moggach, S. Parsns, L. Ronconi, D. Fregona, A. Bindoli. Gold(III)-dithiocarbamate complexes induce cancer cell death triggered by thioredoxin redox system inhibition and activation of ERK pathway. *Chem. Biol.* **2007**, 14, 1128.
17. L. Ronconi, D. Fregona. The Midas touch in cancer chemotherapy: from platinum- to gold-dithiocarbamate complexes. *Dalton. Trans.* **2009**, 10670-10680.
18. E. Márta, L. Ronconi, C. Nardon, D. Fregona. Noble metal-dithiocarbamates precious allies in the fight against cancer. *Mini-Reviews in Med. Chem.* **2012**, 12(12), 1216-1229.
19. E. Cerrada, A. Moreno and M. Laguna. S, C-and S, S-coupling via dithiolate transfer reactions from tin to nickel complexes. *Dalton Trans.* **2009**, 6825-6835.

20. I. Vermes, C. Haanen, H. Steffens-Nakken. A novel assay for apoptosis flow citometric detection of phosphatidyl serine expression on early apoptotic cells using labelled Annexin V. *J. Immunol. Meth.* **1995**, 184, 39-51.
21. C. Wang, W. Shih, H. Chuan Chang, Y. Kuo, W. Hung, T. Ong, and W. Li. Preparation and Characterization of Amino-Linked Heterocyclic Carbene Palladium, Gold, and Silver Complexes and Their Use as Anticancer Agents That Act by Triggering Apoptotic Cell Death. *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 5245-5249.
22. J. Arcau, V. Andermark, E. Aguiló, A. Gandioso, A. Moro, M. Cetina, J.C. Lima, K. Rissanen, I. Ott, L. Rodriguez. Luminescent alkynil-gold (I) coumarin derivates and their biological activity. *Dalton Transactions*. **2014**, 43, 4426-4436.
23. J. F. Neault, H. A. Tajmir-Riahi. Interaction of cisplatin with human serum albumin. Drug binding mode and protein secondary structure. *Biochim. Biophys. Acta-Protein Struct.Molec. Enzym.* **1998**, 1834, 153-159.
24. L. H. Yue, Y. J. Hu, J. Chen, A. M. Bai, Y. Ouyang. Green synthesis and physical characterization of Au nanoparticles and their interaction with bovine serum albumin. *Colloids Surf. B*. **2014**, 122, 107-114.